

# RESISTENZ PFLANZLICHER ZELLENTHEILE GEGEN LASERSTRAHLEN

Von

Dr. E. MESTER und Dr. V. FRENYÓ

Chirurgische Klinik II. der medizinischen Universität und Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Eötvös Loránd Universität, Budapest

Eingegangen: 30. September 1970

In unserer die Biostruktur anbetreffenden Forschungsarbeit wurde ein Versuch zu einer neueren Anwendung der Lasertechnik angestellt. Ihr gingen zum Teil bereits Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Peroxysom voran (Mester u. Mitarb. 1969). Vorliegende Abhandlung versucht die Kohesion des semipermeablen pflanzlichen Tonoplastes und des photosynthetisierenden Pigmentsystems durch Verwendung von Laserimpulsen zu untersuchen. Beide mikroheterogenen Systeme haben nämlich eine bestimmte Struktur, deren Stabilität sich zwar der Pflanzenart und dem physiologischen Zustand gemäß verändert, jedoch von einer gewissen mechanischen Widerstandsfähigkeit charakterisiert wird, so wie uns zum Beispiel auch die strukturelle Viskosität über die inneren Verhältnisse des Protoplasmas unterrichtet. Die Viskosität der Zellenpartikeln könnten jedoch kaum bemessen werden, weshalb hier der Laser nützlich wird, worüber sich in anderer Hinsicht Karlander und Krauss folgendermaßen geäußert haben (1968): „The development of the laser has added a new tool to those available to the photobiologist“. Unseren Vorstellungen nach können wir durch stufenweise gesteigerte Laserimpulse feststellen, bei welchem Energieniveau die submikroskopische Struktur von der Laserwirkung aufgelöst wird, und dieser Joulesche Wert ( $J/cm^2$ ) kann für die über die geringste Resistenz des Systems verfügende Stelle charakteristisch sein.

Unsere Untersuchung gleicht gewissermaßen dem Verfahren von Majumder (1970), der die Wärmestabilität des Pigmentsystems zur Grundlage genommen hat, sein Parameter ist der sog. Chlorophyllindex, also der Unterschied des Extinktionswertes des vor und nach der Wärmebehandlung auslösbaren Chlorophylls. Vielleicht wurde das Problem unserer Untersuchung auch von dem Untersuchungsergebnis von Hildreth u. Mitarb. (1966) berührt. Es wurde festgestellt, daß sich auf die Wirkung von Laserstrahlen kleinere Intensität (einige mJ) die Lichtabsorption der Chloroplaste vorübergehend verändert. Offensichtlich kann der leicht veränderliche metastabile Zustand des Systems, in

dem dieses zur Reduktion und Oxydation gleichfalls geneigt ist, angenommen werden. Wir haben jedoch unser Problem nicht von physikochemischem Gesichtspunkt, sondern in solcher Weise untersucht, die einen unmittelbaren Einblick in die Verhältnisse der die Plasmamembrane und die Struktur des Pigmentsystems zusammenhaltenden Kräfte ermöglicht. Wir denken, daß diese Methodik in der Zukunft zum Zwecke der Untersuchung der Biostrukturen noch mehr entwickelt werden könnte. Zuzufolge seiner strengen Kohärenz kann das Laserstrahlenbündel auch auf ein submikroskopisches Gebiet fokussiert und auf die intrazellulären Partikeln gerichtet werden sowie eine bekannte Energiemenge — laut R e n t z e p i s (1968) — in etwa  $10^{-8}$  sec auf die gezielte Stelle entsenden. Die Verschiebung der Kolloidteilchen und ihre Umgruppierung ist innerhalb dieser kurzen Zeit unbeträchtlich. Der mechanische Widerstand der strukturellen Teilchen kann demnach gut gemessen werden und zu biophysikalischen, oder sogar bioenergetischen Schlüssen Anlaß geben. Diese noch unter Prüfung stehende Methodik, die wir hier erst noch in primitiver Weise anwenden konnten, verspricht solche Vorteile.

### Methodisches

Die Untersuchungen wurden mit dem ersten und zweiten Blatt der Keimpflanzen des 14tägigen Maises unternommen. Die eine Gruppe der Pflanzen wurde in einer Klimakammer nebst einer Lichtintensität von 10 000 Lux gezüchtet, diese ist normal ergrünt. Die andere Gruppe wurde im Dunkeln gezüchtet, die Pflanzen blieben chlorotisch und vergeilten. Im Laufe des eigentlichen Experiments erfolgte die Laserirradiation nach zwei solchen Varianten, die sich bezüglich der Gegenwart bzw. des Chlorophyllmangels unterschieden haben. Da in den vergeilten Blättern neben dem Karotin das ebenfalls helle Protochlorophyll vorhanden ist, ist die Strahlenabsorption dieser viel geringer als die der grünen Blätter.

Die Strahlenbehandlung ( $\lambda = 6945\text{\AA}$ ) haben wir mit einem Rubinlaser durchgeführt, dessen abgebbare Maximalleistung je Impuls etwa  $5\text{ J/cm}^2$  beträgt. Zu sehr geringen Dosen — z. B. von etwa  $0,05\text{ J/cm}^2$  — haben wir Strahlenfilter verwendet. Bei einem gegebenen Energieniveau wurden die Dosen auch in verschiedenen Wiederholungen angewendet, wobei die Kumulation der Wirkung untersucht wurde.

Der technische Teil der Untersuchungen wurde von der Elektroingenieurin Jolán G. T o t a und dem Aspiranten T h a i D u y N i n h durchgeführt.

### Ergebnisse und Besprechung

Unsere Untersuchungen informativen Charakters zeigten, daß die Strahlendosis  $0,05\text{ J/cm}^2$  sowohl auf das chlorophyllhaltige als auch auf das vergeilte Blatt praktisch genommen keine Wirkung ausübt. Dieses Niveau der Energie ist demnach subminimal und bleibt so sehr unter der



Wirkungsschwelle, daß es selbst die von uns kontrollierten biochemischen Prozesse wahrnehmbar nicht berührt. Wir haben nämlich die irradierten grünen Blätter wiederum in die Klimakammer gesetzt und 24 Stunden lang mit einem gemischten Licht von 10 000 Lux-Intensität beleuchtet. Nachher untersuchten wir mit Jodreaktion, ob es in dem Stärkegehalt der affizierten Stelle gegenüber dem benachbarten Blattgewebe ein Unterschied bestünde. Es wurde kein solcher Unterschied wahrgenommen, was wir in dem Sinne ausgelegt haben, daß die Photosynthese von der angewandten Laserirradiation weder angespornt, noch gehemmt wurde, oder daß ihr Einfluß nicht länger als 24 Stunden anhält. Auch auf den Prozessen der Chlorophyllbildung ist die Strahlendosis  $0,05 \text{ J/cm}^2$  wirkungslos, da die so behandelten vergelbten Blätter in der hellen Klimakammer nach 24 Stunden gleichmäßig ergrünt sind; in dem der Laserirradiation ausgesetzten Gewebeteil ging die Färbung des Protochlorophylls in demselben Tempo vor sich, wie in den benachbarten Geweben, die von der Laserbehandlung nicht berührt worden sind. Da nacheinander zwei- oder sogar dreimal gegebene Dosen, ferner die Dosis  $1 \text{ J/cm}^2$  auf das vergelte Blatt keine Wirkung ausgeübt haben, konnte darauf gefolgert werden, daß die Gewebe des hellen Blattes die Strahlen des Rubinlasers nicht in so hohem Maße absorbieren, das bereits eine Veränderung hervorrufen könnte.

Unsere weiteren Untersuchungen haben wir nur mehr mit grünen Blättern durchgeführt, und zwar mit den in der Tabelle I. angeführten Ergebnissen.

Tabelle I.

## Wirkung von Laserimpulsen auf das grüne Blatt

Laserdosis $\text{J/cm}^2$	Änderung in den irradiierten Geweben	
	unverzüglich	nach einem Tag
$1 \times 1$	geringe Infiltration	Chlorophylldefekt
$2 \times 1$	mittlere Infiltration	schwache Nekrose
$3 \times 1$	starke Infiltration	starke Nekrose
$4 \times 1$	schwache Destruktion	Destruktion
$5 \times 1$	starke Destruktion	Destruktion
$1 \times 5$	Perforation	Kontinuitätsmangel

In der Tabelle sind die eine histologische Änderung andeutenden Stufen subjektiv, da es noch zu keiner anderen Auswertung gekommen ist. Eine Infiltration bedeutet hier so viel, daß in die intrazellulären Gänge des Blattes aus den benachbarten Zellen Feuchtigkeit geraten ist, was die Änderung der Lichtbrechung bezeichnet. An der irradierten Stelle wird nämlich das Gewebe optisch mehr durchschimmernd als die sie umgebenden Gewebe. Wahrscheinlich rührt diese Änderung von der momentanen Wärmewirkung her. Die die Semipermeabilität aufrechterhaltenden Membranen — vor allem der Tonoplast der Zellen — ladierten wahrscheinlich zufolge der plötzlichen, sprungartig ansteigenden Dampfension bzw. der hydrostatischen Druckzunahme. Bei einer Destruktion ist

von den parallelen Blattadern lediglich das Parenchym verletzt. Eine Destruktion bedeutete bereits auch eine biochemische Veränderung. Bei einer Nekrose sind zwar die Zellen abgestorben, jedoch die Zellenwände erhalten geblieben. Bei Perforation und Kontinuitätsmangel ist auch die Blattaderung zerrissen.

Der zu den Versuchen gebrauchte Rubinlaser war nicht dazu geeignet, um das Energieniveau zwischen  $0,05 - 5 \text{ J/cm}^2$  in kleinen Stufen zu steigern, verhalf uns aber doch zu einigen Erkenntnissen; z. B. die Desorganisation irgendeiner Region der Biostruktur erfolgt innerhalb eines bestimmten Energiebereiches, das heißt es muß einen Impuls von kritischem Maße geben, bei dem der Zerfall beginnt. Es ist zweifellos, daß die Blattzellen des jungen Maises dem, aus dem Rubinlaser entsandten, eine Energie von  $0,05 \text{ J/cm}^2$  aufweisenden Impuls vollkommen widerstehen, jedoch hört die Semipermeabilität auf die Wirkung eines einmaligen Impulses von  $1 \text{ J/cm}^2$  auf. Falls wir die Zerreißfestigkeit der Membrane bewerten wollen, so ist das kritische Energieniveau unter  $1 \text{ J/cm}^2$  zu suchen. Die Bestimmung des wirklichen Wertes wird von zahlreichen Umständen — z. B. die protektive Rolle des den Tonoplast umgebenden Mezoplasmas und sogar der die ganze Zelle umhüllenden Zellenwand — beeinflußt. Trotzdem kann die Zerreißfestigkeit des Tonoplastes annähernd bestimmt werden, da der Laserimpuls seine Energie in kurzen Zeitabschnitten ( $< 10^{-3} \text{ sec}$ ) abgibt und so die Erschütterung der Zellenorganellen innerhalb des Systems sich kaum weiterpflanzen kann, also auf diese Weise mit der Abbremsung der Wirkung nicht unbedingt zu rechnen ist.

Es muß hier erwähnt werden, daß der Mikromanipulator zur Bestimmung der Zerreißfestigkeit des Tonoplastes ungeeignet ist, da es den Lipoidmolekülen Zeit gegeben ist, um sich von der angegriffenen Stelle zu verschieben; in der Membrane kann daher eine innere Umordnung vor sich gehen. Die von dem Laser hervorgerufene Wirkung erreicht zufolge des sekundär auftretenden hydrostatischen Druckes in einem Augenblick auf einmal die ganze Umrißlinie des Tonoplastes, was vermutlich seine unmittelbare Ruptur verursacht. Die Ruptur erfolgt wahrscheinlich nicht von der Vakuole nach außen zu, sondern im Gegenteil einwärts. Die Stelle der Strahlenabsorption ist nämlich die Schicht der Chloroplaste, die sich wiederum im Mezoplasma befindet; der Druck greift demnach die Membrane von der Peripherie her an (Abb. 1).

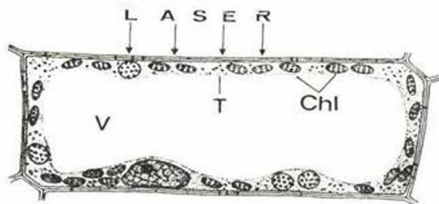


Abb. 1. Die Laserstrahlen werden in der Blattzelle von den Chloroplasten (Chl) absorbiert. Die Wirkung überträgt sich von hier aus auf den Tonoplast (T) und auf die Vakuole (V).



Der in den Zellen auftretende Druck kann auch aufgrund des auf eine Zelle fallenden Impulses ( $i$ ) charakterisiert werden:

$$i = \frac{J - D}{\text{cm}^2 \cdot Z},$$

wo  $J$  der J o u l e s c h e Wert des aus dem Laser entsandten Impulses ist,  $D$  die nach dem Durchdringen des Blattes nicht absorbierte Restenergie des Laserstrahles,  $Z$  die Zellenzahl der irradiierten Fläche bedeutet. Die Dicke des Blattes kann die Formel kaum ungünstig machen, da ja in den zweiten, dritten usw. Zellschichten  $D$  den Wert der von dem Laser her kommenden Strahlung vertritt und  $D_1, D_2 \dots D_n$  durch die nacheinander folgenden Zellschichten weiterdringt.

Auf dem mit  $1 \text{ J/cm}^2$ -Dosis irradiierten Blatt zeigte sich nach einem Tage der auf der Photoaufnahme sichtbare Defekt; an der Stelle der Irradiation verschwand das Chlorophyll, sodann trockneten die Zellen aus, was außer der physikalischen Evaporation auch die Adsorption des Wassers der benachbarten intakten Zellen fördern konnte (Abb. 2). Auch andere inhaltliche Teile, z. B. Chloroplastfragmente entleeren sich zum guten Teile aus den Zellen, was auf eine Autolyse, also auf die Aktivierung der zersetzenden Enzyme verweist. Dies trifft wahrscheinlich, insbesondere im Falle der Chlorophyllase sekundär ein. Dieses Desmoenzym bindet sich stark an die Struktur des Chloroplastes (A m m o n — D i r s c h e r l 1948), also sein Freiwerden bedingt die Desorganisation des Chloroplastes. Dies beginnt aller Wahrscheinlichkeit nach in den Grana des Farbkörperchens, wo sich schichtenweise das absorbierende Farbmateriale befindet (Abb. 3—4). Es ist fast mit Sicherheit anzunehmen, daß auch der färbige Mg-Porphyrin-Teil des Chlorophyllmoleküls von der in Lipoidschichten gebetteten abreißt (Abb. 5). Unsere Annahme könnte mit einer chromatographischen Analyse kontrolliert werden, zu der es aber noch nicht gekommen ist.

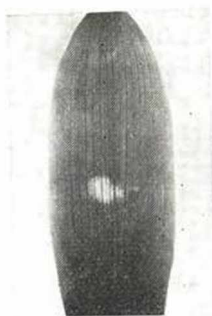


Abb. 2. Chlorophylldefekt auf dem Blatt an der Irradiationsstelle.

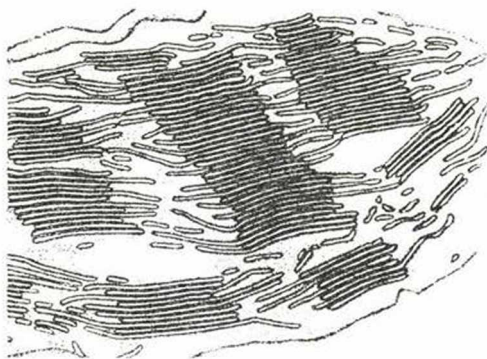


Abb. 3. Die schichtenhafte Struktur des Chloroplastes. Nach H. Mohr.

Unsere Angaben informieren uns gut über die Kumulation der Wirkung. Die Wiederholung der Laserdosen steigert den Effekt, jedoch nicht proportioniert:  $5 \times 1 \text{ J/cm}^2 \neq 1 \times 5 \text{ J/cm}^2$ ! So sehr es auch leicht ist einzusehen, daß es so sein müßte, können wir dennoch nicht immer in diesem Sinne rechnen. Deshalb ist es nicht überflüssig zu betonen, daß bei der Untersuchung der Biostrukturen die auf einmal gegebene kritische Energiedosis für geeigneter scheint, als die Wiederholung kleiner Dosen.

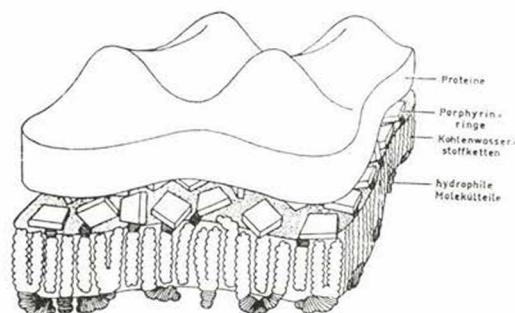


Abb. 4. Teil der inneren Struktur des Chloroplastes mit der Lage der Chlorophyllmoleküle.  
(Skizze aus dem Werk von H. Mohr).

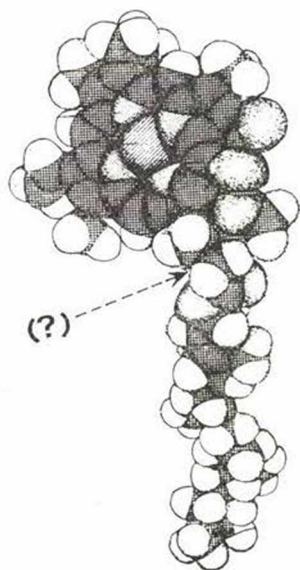


Abb. 5. Das Modell des Chlorophyllmoleküls. Das Fragezeichen weist die Stelle an, an der auf die Wirkung des Laserimpulses wir den Bruch für möglich halten.  
(Modifiziertes Bild nach H. Mohr).

### Zusammenfassung

Mit Hilfe von Laserimpulsen haben wir in den Zellen von jungen Maisblättern die mechanische Widerstandsfähigkeit der die Struktur der Zentralvakuole umgrenzenden Membrane (Tonoplast) und der lichtabsorbierenden Chloroplasten untersucht. Auf diese Weise versuchten wir uns darüber zu informieren, von welcher großen inneren physikalischen Kräften die verschiedenen Bestandteile des Protoplasmas zusammengehalten werden. Das kritische Energieniveau der Impulse, bei welchen die Ruptur eintritt, liegt zwischen:  $0,05 - 1 \text{ J/cm}^2$ .

Die Wirkung der Laserstrahlen ist nur auf den pigmentierten Stellen unmittelbar; farblose Partikeln destruieren sich in indirekter Weise, z. B. zufolge des in dem System auftretenden hydrostatischen Druckes.

Auch die Kumulation in der Wirkung der Dosen kann nachgewiesen werden, doch erwies sie sich nicht als mit der Zahl der Dosen proportioniert.

Der Laser scheint, zur Bestimmung der Kohäsion der Biostrukturen geeignet zu sein, doch muß die Methodik von dem Anfangsstadium weiter entwickelt werden.

## SCHRIFTTUM

- Ammon, R. — Dirscherl, W. 1948. Fermente, Hormone, Vitamine und die Beziehungen dieser Wirkstoffe zueinander. G. Thieme, Leipzig, 1051 p.
- Hildreth, W. W. — Avron, M. — Chance, B. 1966. Laser activation of rapid absorption changes in spinach chloroplasts and Chlorella. *Plant Physiology* **41**: 983–991.
- Karlander, E. P. — Krauss, R. W. 1968. The laser as a light source for the photosynthesis and growth of Chlorella vannieli. *Biochim. Biophys. Acta* **153**: 312–314.
- Majumder, S. K. 1970. Heat stability of chlorophyll as an index of adaption for overwintering. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **161**: 174–177.
- Rentzepis, P. M. 1968. Lasers in chemistry. *Photochem. and Photobiol.* **8**: 579–588.